

Casein 효소 가수분해물의 항균 활성과 그 응용

이혜진 · 이상덕 · 오만진[†]
충남대학교 식품공학과,

Application and Antimicrobial Activities of Casein Hydrolysates Treated with *Asp.oryzae* Protease

Hye-Jin Lee, Sang-Duk Yi and Man-Jin Oh[†]

Department of Food Science and Technology Chungnam National University Daejeon, 305-764, Korea

Abstract

This study was carried out to produce antimicrobial peptides from casein using various proteases. To examine whether the hydrolysis of casein would produce antimicrobial substance and the application as natural antimicrobial material, casein was hydrolyzed by five different proteases. The casein hydrolysate was fractionated with regenerated membrane filter (molecular weight cut-off 30,000 10,000 and 3,000) and antimicrobial activity was measured for each fraction. Antimicrobial activity appeared great in the fraction below 3,000 molecular weight. The fraction was re-fractionated by high performance liquid chromatography and substance of main peak (retention time: 13.2 min) collected was used as a sample to measure antimicrobial activity. Among the casein hydrolysates produced by protease, antimicrobial activity was observed the greatest in hydrolysate treated with *Aspergillus oryzae* protease. The minimum inhibition concentrations of the *Asp. oryzae* protease hydrolysate were 1.0-1.5 mg/mL. This hydrolysate was a heat stable peptide since antimicrobial activity was maintained after treating with heat for 20 min at 121 °C.

Key words : antimicrobial activity, casein hydrolysate, protease

서 론

식품의 품질은 가공, 저장 과정 중에 일어나는 산화, 미생물에 의한 부패 및 효소 작용 등에 의해 좌우된다. 특히, 식품의 부패 및 변질은 주로 미생물에 의하여 일어나는데, 미생물 오염을 방지하고 식품의 저장성을 연장하기 위해 합성 보존료를 이용해왔다. 보존료가 첨가된 가공식품을 지속적으로 섭취하게 되므로 이들 성분과 혼합물이 체내에 축적될 경우 대사에서 독성을 나타낼 수도 있으므로 오랜 식생활을 통하여 안전하다고 믿어지는 천연 항균성 물질을 이용하고자 하는 연구가 수행되어 왔다(1,2).

천연 항균성 물질에 대한 연구로는 마늘(3-5), 양파(6,7) 등의 향신료(8)와 한약재 등의 천연식물(9,10), 병원성 및 부패성 미생물에 대한 유기산 등(11-14)이 있다. 또한 젖산

균에 의해 생성되는 bacteriocin류(15-17), 식물추출물(18-21), chitosan(22), lysozyme(23,24) 녹차의 catechin 등(25)이 있다.

근래 천연물에 대한 항균물질 연구(26,27)가 활발히 수행되어져 다양한 천연물의 항균활성이 인정되었지만, 천연추출물은 합성보존료에 비해 항균활성이 떨어지고 특정 미생물에서만 항균활성을 나타내므로 실용성이 떨어지고 있다.

천연물 중 단백질이나 peptide는 안전하고 생리활성이 강하여 쉽게 얻어질 수 있으므로 많은 연구자들이 단백질 분해물에 대한 항균활성에 관심을 가지게 되었다.

우유 중에서 분리 정제한 lactoferrin에 관한 생리활성과 항균활성에 대한 연구결과(26-28) 많이 보고 되었으며 lactoferrin은 철의 흡수·저장 및 이용뿐만 아니라 여러 종류의 미생물의 성장 저해제로 잘 알려져 있다.

Pellegrini 등(29,30)은 bovine α -lactalbumin과 β -lactoglobulin에 단백질 분해효소를 작용시켜 항균 peptide를 분리하여 아미노산 결합 순서를 밝혔고, Gram(+) 세균에서 항균활

[†]Corresponding author. E-mail : ohmj@cnu.ac.kr,
Phone : 82-42-821-6728, Fax : 82-42-821-6728

성이 더 크게 나타낸다고 보고한 바 있다. Dionysis 등(31), Tomita 등(32)도 우유 중에 존재하는 bovine lactoferrin으로부터 lactoferrin이라는 물질을 얻고, 원 단백질보다 8배 이상 높은 항균력이 있다고 보고하였다. 또한 식물성 단백질인 대두의 효소가수분해물의 항균활성을 측정하고 항균 peptide의 아미노산 서열을 밝힌 바 있다(33,34).

항균성 casein 효소가수분해물의 펩타이드가 동정(35)된 이래 as2-casein은 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus canosus*의 성장저해제로 밝혀졌으며(36,37) as1-casein은 in vivo에서 *Staphylococcus aureus*와 *Candida albicans*에 항균활성을 보이며(38), human β -casein은 *Klebsiella pneumoniae*에 대한 항균력을 있다고 보고한 바 있다(39).

본인 등은 이용성이 높은 *Asp. oryzae* 기원의 protease을 casein에 작용시켜 가수 분해물을 제조하고 항균활성을 확인하여 분자량 별로 분획하여 부분 정제하고 그 실용성을 검토하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재 료

단백질 가수분해물을 제조하기 위한 bovine casein과 단백질 가수분해 효소 pepsin (porcine stomach mucosa EC 3.4.23.1), bromelain (EC 3.4.22.32), *Aspergillus saitoi* protease(EC 3.4.23.18), *Aspergillus sojae* protease, *Aspergillus oryzae* protease는 Sigma -Aldrich사 제품을 사용하였다.

Ultrafiltration cell은 Amicon사 제품, membrane은 regenerated cellulose(molecular weight cut off 30,000, 10,000, 3,000) Millipore 사 제품, 항균활성 측정용 paper disc(8mm)는 Toyorhoshi 사 제품을 사용하였다.

HPLC는 영린기기, column은 C₁₈ column, HPLC 용매는 Sigma Aldrich 사 제품, 기타 시약은 1급 이상을 사용하였다.

공시균주

항균활성 측정에 사용된 공시균주인 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115는 한국 생명공학연구원에서 분양받아 사용하였으며 항균활성 측정에 사용된 배지는 Difco 사의 영양한천배지를 기충용 배지, Mueller Hinton medium을 증충용 배지로 사용하였다.

효소 가수분해물의 제조

10% casein 용액을 85°C, 15분간 열처리하고 기질과 효소 비율이 30:1(w/w)이 되도록 효소를 첨가하여 효소의 최적 반응 온도인 37°C에서 4시간 진탕항온조에서 가수분해 시켜 12,000 x g에서 15분간 원심분리 한 후 상정액을 취하여

항균활성을 측정하였다.

가수분해율 측정

효소의 반응시간에 따른 casein의 가수분해도는 trinitrobenzene-sulphonic acid (TNBS) 법(40)에 의해 측정하였다. 1% sodium dodecyl sulfate용액에 희석된 재료 0.25 mL와 0.1 M-phosphate buffer (pH 8.2) 2 mL를 혼합 후 0.1% TNBS 용액 2 mL를 첨가하여 50°C에서 1시간 동안 빛을 차단한 상태에서 반응시켜 0.1N HCl 4 mL로 반응을 중지한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하여 가수분해율을 계산하였다.

항균 활성 측정

항균활성은 paper disc법(41)으로 측정하였다. 영양한천 고체배지를 살균한 후 petri dish에 15 mL씩 분주하여 기충 배지로 하고, 이에 0.75% agar함유 영양배지를 각각 2.5 mL씩 시험관에 분주하여 멸균한 후 45°C의 수욕상에 보존하면서 각종 시험균액 0.1 mL을 무균적으로 첨가하여 잘 혼합한 후 기충용 배지 위에 고르게 펴지도록 도포 한 뒤 응고시켜 2중의 균 접종 평판배지를 만들어 사용하였다.

0.45 μ m membrane filter로 여과하여 제균하고 멸균한 단백질 가수분해물 상정액 200 μ L을 paper disc에 loading하여 시험용 평판배지 위에 밀착시킨 후 37°C 에서 24시간 배양 후 disc 주변 inhibition clear zone의 직경을 mm단위로 측정하여 항균활성을 비교하였다.

최소저해농도 측정

분자량 3,000이하의 가수분해 동결건조물을 0.5 mg-2.5 mg/mL이 되도록 영양한천배지에 첨가하여 응고시킨 후 공시균주 배양 현탁액을 도말한 다음 37°C, 24시간 배양하여 균이 증식 되지 않는 농도를 최소저해농도로 하였다.

미생물 생육 저해도 측정

동결건조한 분자량 3,000 이하의 가수분해물을 3 mg/mL의 농도가 되도록 영양액체배지에 첨가하고 100°C, 10분간 살균하여 *Bac. subtilis*를 접종하고 37°C에서 배양하면서 경시적으로 620 nm에서 흡광도를 측정하여 미생물 생육저해 정도로 표시하였다.

항균성 가수분해물의 분자량별 분획

Casein 가수분해물을 한외여과장치 (Amicon Co.)에 각각의 molecular weight cut-off 3,000, 10,000, 30,000 인 membrane filter를 장착시키고 질소가스로 50 psi의 압력을 가하여 여과 한 후 분자량별 분획에 대하여 항균활성을 측정하였다.

High performance liquid chromatography 에 의한 항균성 가수분해물의 분리

분자량별 한외여과에 의해 분리한 항균활성 분획을 동결 건조하여 농축한 후 sep-pak로 여과하여 HPLC를 이용하여 분리하였으며 분석조건은 Table 1과 같다.

각 peak의 분획물을 반복 수집하여 항균활성을 측정하였다.

Table 1. Operating conditions of HPLC for the purification of antimicrobial peptide of the hydrolysate in the casein treated with protease

Instrument	Young Lin Co.
Detector	Diode Array U. V. detector 220nm, 280nm
Column	Jupiter 15 u C18 (200×10mm)
Mobile phase	100% 10mM phosphate buffer (pH7.0)
Flow rate	2.0 ml/min
Injection volume	100µl

된장에 대한 항균성 가수분해물의 응용

항균활성이 있는 분자량 3,000이하의 분획물을 동결건조하여 된장에 3 mg/mL의 농도로 첨가하고 저장하면서 일반 세균수를 측정함으로써 식품보존제로서의 응용성 여부를 검토하였다.

결과 및 고찰

효소 종류에 따른 가수분해물의 항균활성

Casein에 *Asp. oryzae*를 비롯한 5종의 protease를 가하여 37°C에서 24시간 작용시킨 가수분해물의 항균활성은 Table 2와 같다.

Table 2. Antimicrobial activity of hydrolysates of casein treated with various proteases

Enzyme source	Strains*				
	B.S	S.A	S.T	E.C	L.M
Pepsin	±**	+	±	-	-
Bromelain	+	+	±	+	-
<i>Asp. saitoi</i> protease	++	+	+	±	+
<i>Asp. sojae</i> protease	+	+	+	+	±
<i>Asp. oryzae</i> protease	+++	++	+	++	+

*B.S : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, S.A : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ST : *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, E.C : *Escherichia coli* ATCC 9637, L.M : *Listeria monocytogenes* ATCC 19115
 ** - : negative activity, ± : weak activity
 ++ : strong activity, +++ : very strong activity.

Casein 가수분해물의 항균활성은 일반적으로 미생물 기원의 protease로 처리한 것이 식물기원의 protease로 처리한 것보다 높았으며 공시균주에 따라 항균활성이 달랐다.

Asp. oryzae 기원의 protease로 처리한 것 casein가수분해물이 항균활성이 가장 높아 차후의 실험에서는 이 효소를 작용시켜 얻어진 가수분해물을 이용하여 실험을 행하였다.

효소반응 시간에 따른 casein의 가수분해율

Casein 용액에 *Asp. oryzae* protease를 37°C에서 작용시켜 가면서 시간에 따른 가수분해 정도를 측정한 결과는 Fig. 1 와 같다.

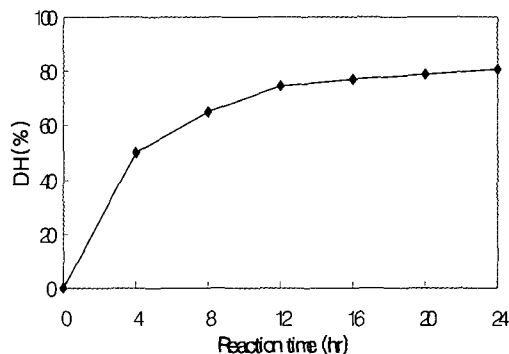


Fig. 1. Degree of hydrolysis of casein treated with *Asp. oryzae* protease at 37°C.

Asp. oryzae protease에 의한 casein의 가수분해율은 Fig. 1.에서 보는 바와 같이 효소 반응 12시간까지 증가하였으며 항균활성과 가수분해율과는 상관관계가 있었다.

Yoon 등(42)은 casein에 키위 단백질 효소를 작용시켰을 때 반응 20분 이상에서 80% 이상의 가수분해율을 나타낸다고 보고하였다. 이는 효소의 활성도 및 순도, 기질에 따른 효소 첨가량에 따라 차이가 큰 것으로 보여 본 결과 단순 비교하기에는 어려운 점이 있다.

항균활성 가수분해물의 열 안정성

항균활성을 가지는 casein 가수분해물을 80°C에서 10분간, 100°C에서 10분간, 121°C에서 10분간 각각 열처리 한 후 분해물의 항균활성을 측정하여 열에 대한 안정성을 검토한 결과 Table 3과 같다.

Casein 가수분해물은 100°C와 121°C에서 15분간 열처리 하더라도 공시균주에 대한 항균활성이 변화가 없는 것으로 보아 casein의 *Asp. oryzae*에 의한 가수분해물은 열에 매우 안정하여 식품에 보존제로서 이용할 때에 실용성이 높을 것으로 생각된다.

Table 3. Antimicrobial activity of casein hydrolysate after heat treatment on the strain

Strains	(diameter of inhibition zone : mm)			
	Heating treatment			
	Control	80°C 10min	100°C 10min	121°C 15min
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	20	20	21	20
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	19	18	20	19

최소저해농도 측정

공시균주에 대한 casein 효소 가수분해물을 분자량 3,000이하로 분획하여 얻어진 동결건조물의 최소 저해농도를 측정한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. Minimal inhibitory concentrations of the casein hydrolysate on the strain

Strains	Concentration(mg/mL)				
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	*	-	+	++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	+	+	++
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1925	-	+	+	++	+++
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	-	±	+	+	++
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	-	-	±	+	++

* : negative activity, ±: very weak activity, + : weak activity
++ : strong activity, +++ : very strong activity.

각 균주에 대한 casein 가수분해물의 최소저해농도는 1.0~1.5 mg/mL로 나타났다.

Recio 등(36)은 casein에 pepsin을 작용시켜 두 개의 항균성 peptide를 분리, 정제하고, 항균성과 용혈작용이 있음을 밝혀내었고 이는 peptide의 구조와 소수성과 관계가 있다고 보고하였으며 Tomita 등(32)은 lactoferrin의 효소 가수분해물에서 대장균에 대한 MIC를 2 mg/mL로 보고하였다.

Casein의 *Asp. oryzae* protease 에 의한 가수분해물의 최소저해 농도는 1.0~1.5 mg/mL로 lactoferrin이나 casein 가수분해물에 비하여 다소 높았다.

Casein 가수분해물의 미생물에 대한 생육 저해

*Bac. subtilis*에 대한 액체배지에서 casein 가수분해물의 생육저해정도를 측정한 결과는 Fig. 2과 같다.

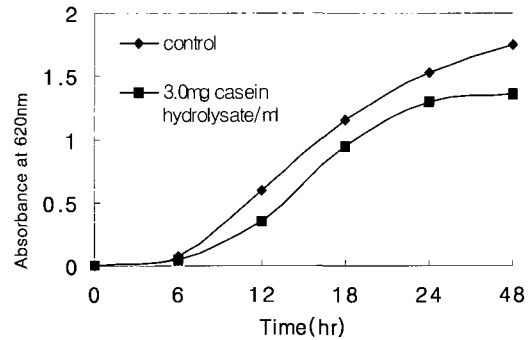


Fig. 2. Growth curve of Bacillus subtilis ATCC 6633 in nutrient broth media added casein hydrolysate.

가수분해물은 고체배지에서 측정 한 최소저해농도 1.0~1.5 mg/mL보다 약간 높은 농도에서 두 공시균주에 대하여 성장을 저해하였지만 완전히 정지시키지는 못하였고 균의 증식을 억제하는 결과를 나타내었다.

Ultrafiltration 분획

Casein 단백질 가수분해물의 원심분리액을 molecular weight cut-off 30,000, 10,000, 3,000 의 membrane이 부착된 Amicon으로 분획하여 항균 활성을 측정한 결과 Fig. 3와 같았다. 각 membrane으로 분획한 상정액이 항균활성을 나타내었고 분자량 3,000이하에서도 항균활성을 나타내었으므로 비교적 저분자량의 peptide가 항균활성을 가지는 것으로 확인할 수 있었다.

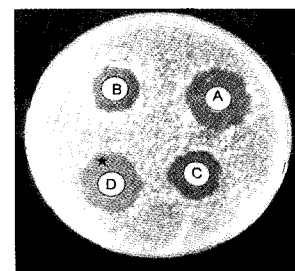


Fig. 3. Antimicrobial activities of fractionated casein hydrolysates by ultrafiltration against Salmonella typhimurium KCTC 1925.

A : Supernatant of casein hydrolysate
B : Filtrate of casein hydrolysate by 30,000 molecular weight membrane.
C : Filtrate of casein hydrolysate by 10,000 molecular weight membrane.
D : Filtrate of casein hydrolysate by 3,000 molecular weight membrane.

High performance liquid chromatography

Ultrafiltration 결과 적은 분자량을 가지는 3,000 이하의 분획물을 Sep-pak으로 여과하여 HPLC로 분석한 chromatogram은 Fig. 4, 5과 같았으며 각각의 peak를 유출시 간대별로 분취하여 Bacillus subtilis에 대하여 항균활성을 측정한 결과는 Fig. 6, 7과 같았다.

Casein 효소 가수분해물을 3,000이하의 membrane으로

한외여과한 후 HPLC의 UV detector의 검출파장을 220 nm, 280 nm에서 고정하고 나타나는 peak의 fraction을 반복, 수집하여 항균활성을 측정된 결과 220 nm에서는 retention time 13.2분. 280 nm에서는 retention time 12.6분에서 항균활성을 나타내었으며 항균활성 peptide에 대한 정확한 분자량, 아미노산 결합 순서에 대하여 차후에 연구를 수행할 계획이다.

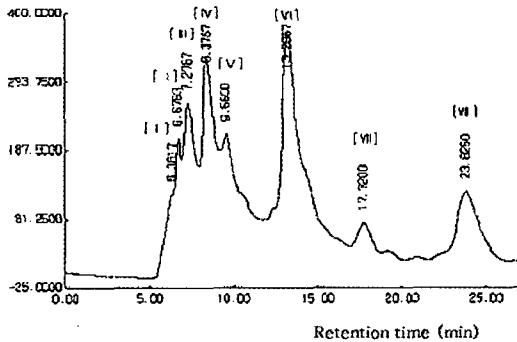


Fig. 4. High performance liquid chromatogram of the casein hydrolysate filtered with membrane filter (molecular weight cut-off 3,000). The elution was monitored at 220 nm.

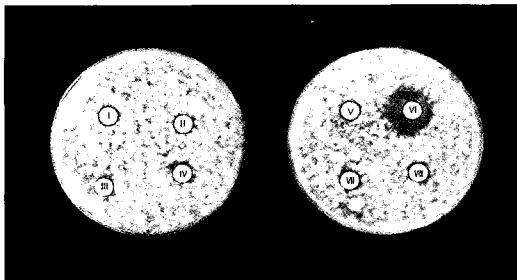


Fig. 5. Antimicrobial activities of the peak fractions of HPLC detected at 220 nm on the *Bacillus subtilis* ATCC 6633

I : peak (I), II : peak (II), III : peak (III), IV : peak (IV), V : peak (V), VI : peak (VI), VII : peak (VII), VIII : peak (VIII).

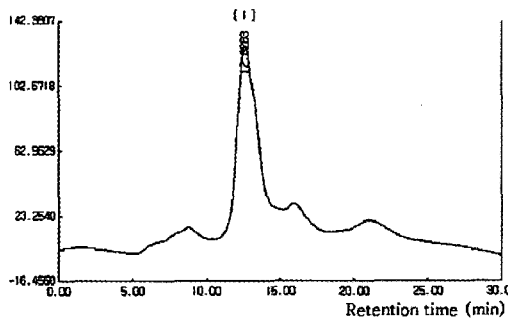


Fig. 6. High performance liquid chromatogram of the casein hydrolysate filtered with membrane filter (molecular weight cut-off 3,000). The elution was monitored at 280nm.

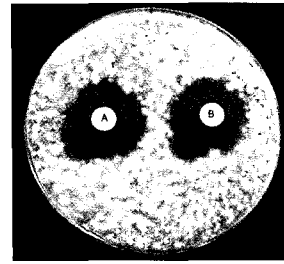


Fig. 7. Antimicrobial activities of the peak fractions of HPLC monitored at 280nm on *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

A : Supernatant of casein hydrolysate, B : Peak (I).

된장에 대한 항균성 가수분해물의 응용

항균활성이 있는 분자량 3,000이하 가수분해물을 된장에 0.3% 첨가하고 80°C에서 30분간 열처리한 후 30°C에서 저장하면서 경시적으로 된장중의 미생물수를 측정된 결과는 Fig. 8와 같다.

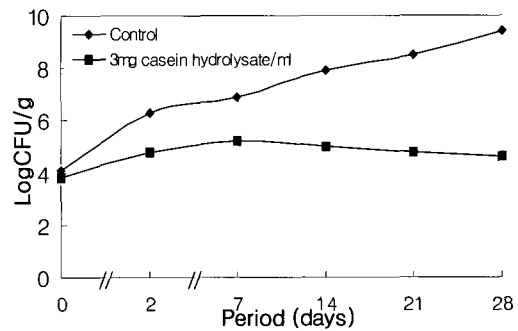


Fig. 8. Preservative effect of casein hydrolysate in *Doenjang*.

가수분해물을 첨가하고 열처리한 된장은 저장 28일까지 안정적으로 저장할 수 있었으며 casein 가수분해물을 된장에 첨가하는 것은 영양적으로도 품질이 향상 되고 저장성에도 효과적이거나 제조원가가 높아지는 단점을 가지고 있어 실용하기에는 검토가 필요하다고 하겠다.

요 약

단백 효소 가수분해물의 천연 항균제로서의 응용성을 검토하기 위하여 casein에 5종의 단백질 가수분해 효소를 작용시켜 얻어진 가수 분해물의 항균활성을 측정하고 활성이 가장 높은 가수분해물을 부분 정제하여 그 응용성을 검토하였다. Casein에 5종 단백질 분해효소를 작용시켜 얻은 가수분해물의 항균활성은 *Aspergillus oryzae* protease에 의한 것이 가장 높았다. 효소처리에 의하여 얻어진 가수분해물을 30,000, 10,000, 3,000 membrane filter로 한외여과 하였을 때 항균활성은 3,000이하 분획물에 대부분 함유되어 있었으며 공시균주에 대한 최소저해농도는 1.0~1.5 mg/mL

이었다. *Aspergillus oryzae* protease로 작용시킨 casein 가수분해물은 121°C에서 10분간 가열했을 때도 그 항균 활성을 유지하는 것으로 보아 열에 안정하였다. 가수분해물을 HPLC로 220 nm, 280 nm에서 검출된 peak 별로 수집하여 항균활성을 측정 한 결과 retention time 12.6, 13.2 분에서 분취된 peptide가 활성이 있었다. 가수분해 동결건조물을 된장에 첨가하였을 때 미생물의 생육이 저해되었으며 실용성이 있었다.

참고문헌

- Lee, B.W. and Shin, D.H. (1991) Antimicrobial Effect of Some Plant Extracts and Their Fractionates for Food Spoilage Microorganisms. J. Korean Food Sci. Technol., 23, 200-204
- Kwon, O.J. and Byun, M.W. (1996) Screening of natural antibacterial substance and effects of gamma irradiation on the their activity. Life Resources and Industry, 1, 32-38
- Al-Delaimy, K.S. and Ali, S.H. (1970) Antibacterial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria. J. Sci. Food Agric., 21, 110-112
- Conner, D.E. and Beuchat, L.R. (1984) Effects of essential oil from plants on growth of food spoilage yeasts. J. Food Sci., 49, 429-434
- Cho, N.C. and Jhon, D.Y. (1988) Effests of garlic extracts on the aerobic bacteria isolated from *Kimchi*. Korean J. Food Sci. Technol., 20, 357-362
- Shama, A., Tewari, G.M., Shrikhande, A.J., Padwal-Desai, S.R. and Bandy P. (1979) Inhibition of aflatoxin-producing fungi by onion extracts. J. Food Sci., 44, 1545-1547
- Johnson, M.G. and Vaughn, R.H. (1969) Death of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in the presence of freshly reconstituted dehydrated garlic and onion. Appl. Microbiol., 17, 903-905
- Beuchat, L.R. and Golden, D.A. (1989) Antimicrobials occuring naturally in foods. Food Technol., 43, 134-142
- Park, S.W. and Kim, C.J. (1979) Studies on the food preservation by anrimicrobial action of medicinal herbs. J. Korean Agric. Chem. Soc., 22, 91-96
- Pack, U.Y., Chang, D.S. and Cho, H.R. (1992) Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. J. Korean Soc. Food Nutr., 21, 91-96
- Entani, E., Asai, M., Tsujihata, S., Tsukamoto, Y. and Ohta, M. (1998) Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7. J. Food Prot., 61, 953-959
- Tamblyn, K.C. and Conner, D.E. (1997) Bactericidal activity of organic acid against *Salmonella typhimurium* attached to broiler chicken skin. J. Food Prot., 60, 629-633
- Eifert, J.D., Hackney, C.R., Pieson, M.D., Duncan, S.E. and Eigel, W.N. (1997) Acetic, lactic, and hydrochloric acid effects on *Staphylococcus aureus* 196E growth based on a predictive model. J. Food Sci., 62, 174-178
- Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.P. and Begin, A. (1997) Inhibitory effect of organic acids upon meat spoilage bacteria. J. Food Prot., 60, 246-253
- Daeschel, M.A. (1989) Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservation. Food Technol., 43, 164-167
- Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanaka, H., Akimoto, M., Kanai, S. and Miki, T. (1998) *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. J. Food Sci., 63, 544-547
- Sible R. (2003) Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. CRC Press, p.11-57
- Chung, K.T., Thomasson, W.R. and Wu-Yuan, C.D. (1990) Growth inhibition of selected food-borne bacteria, particularly *Listeria monocytogenes* by plant extracts. J. Appl. Bacteriol., 69, 498-503
- Kyung, K.H. and Fleming, H.P. (1997) Antimicrobial activity of sulfur compounds derived from cabbage. J. Food Prot., 60, 67-71
- Hao, Y.Y., Brackett, R.E. and Doyle, M.P. (1998) Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. J. Food Prot., 61, 307-312
- Han, J.S., Lee, J.Y., Back, N.I. and Shin, S.H. (2001) Isolation and antimicrobial action of growth inhibitory subdtance on food borne microorgansims from *Dryopteris crassirhizoma* Nakai. Korean J. Food Sci. Technol., 33, 611-618
- Simpson, B.K., Gagne, N., Aschie, I.N.A. and Noroozi, E. (1997) Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp. Food Biotechnol., 11, 25-44
- Oh, H.R. and Bae, K.H. (1987) The Antibacterial Activities of Lysozyme Isolated from the Egg White of Ogol Fowl. J. Korean Soc. Food Nutr., 16, 364-370
- Johansen, C., Gram. L and Meyer, A.S. (1994) The combined inhibitory effect of lysozyme and low pH on growth of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., 57, 561-566

25. Kim, Y.G. (1995) Antibacterial Activities of Korean and Foreign Green Tea Extract. *Kor. J. Env. Hith. Soc.*, 21, 39-46
26. Shaoheng H., Alan R., McEuen, S.A., Blewett, P.L., Mark B., Paul L., and Andrew F.W. (2003) The inhibition of mast cell activation by neutrophil lactoferrin uptake by mast cells and interaction with trypase, chymase and cathepsin G. *Biochemical Pharmacology*, 65, 1007-1015
27. Michel J.F. and Brent, J.S. (1996) Antibacterial activity of lactoferricin, lysozyme and EDTA against *Salmonella enteritidis*. *J. Dairy*, 6, 303-313
28. Han, S.Y. and Kim, J.W. (1998) Studies on the Antibacterial Activity of Enzymatic Hydrolyzates of Lactoferrin Derived from Bovine Colostrum. *J. Agri. Sci. Chungnam Nat'l Univ.*, 25, 52-67
29. Antonio P., Ursula T., Nadine B., Peter H. and Roland von F. (1999) Isoalation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactoalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426, 439-338
30. Antonio, P., Garmen, D., Ursula, T. and Peter, H. (2001) Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1526, 131-140
31. Dionysius, D.A. and Milne. J.M., (1997) Purification and characterization antimicrobial peptides of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.*, 80, 667-674
32. Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabashi, H. and Kawase. K. (1991) Potent antimicrobial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.*, 74, 4137-4141
33. Lovsin K., Zelenik-Blatnik, M. and Abram., V. (1995) Isolation low molecular hydrophobic bitter peptides in soybean protein hydrolysates by reversed-phased high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography*. 704, 113-120
34. Joo, J.H, Yi, S.D., Lee, G.H. and Oh, M.J. (2004) Antimicrobial Activity of Soy Protein Hydrolysate with *Asp. saitoi* Protease. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 33, 229-235
35. Park, S.Y., Gibbs, B.F., and Lee, B.H. (1996) Identification of peptides derived from β -casein hydrolysates by proteolytic enzymes. *Kor. J. Dairy Sci.*, 18, 237-246
36. Isidra, R. and Servas, V. (1999) Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α 2-casein. *Biochemica et Biophysica Acta* 14528, 314-326
37. Zucht, H.D., Raida, M., Adermann, K., Magert, H. J. and Forssma, W.G. (1995) casein α 2-derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS letters*, 372, 185-188
38. Lahov, E. and Regelson, W. (1996) Antibacterial an immuno stimulation casein-derived substances from milk: Caseicidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 131-145
39. Migloire S.D., Floch, F. and Jolles, P. (1989) Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J. Dairy Research*, 56, 357-362
40. Adler-Nissen, J. (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 1256-
41. MacLowry, J.D. and Jaqua, M.J. (1970) Detailed methodology and implementation semiautomated serial dilution microtechnique for antimicrobial susceptibility testing. *Appl. Microbiol.*, 20, 46-53
42. Yoon, S., Choi, H.J. and Lee, J.S. (1991) Modification of functional properties of casein by kiwifruit protease. *Korean J. Soc. Food Sci.*, 7, 93-100

(접수 2005년 10월 31일, 채택 2006년 1월 20일)